

Afdeling Contaminanten 1982-10-11
Verslag: 82.80 pr.nr. 505.0620

Onderwerp: Overzicht stand van zaken
m.b.t. het ontwikkelen van analysemetho-
den voor het bepalen van enkele hormonen
m.b.v. GC-MS.

Verzendlijst: directeur, directie VKA, sektorhoofd (3x), afdeling Con-
taminanten, afdeling Normalisatie (Humme), Projektbeheer.

Project: Ontwikkeling methoden voor het aantonen en bepalen van hormonen.

Onderwerp: Overzicht stand van zaken m.b.t. het ontwikkelen van analysemethoden voor het bepalen van enkele hormonen m.b.v. GC-MS.

Voorgaande verslagen: 81.61; 81.92

Doel:

Het vastleggen van enkele relevante gegevens voor de gaschromatografie-massaspectrometrische analyse van hormonen i.v.m. de bepaling in urine.

Samenvatting:

Een achttal anabole stoffen zijn geselecteerd als zijnde mogelijke verbindingen welke in de toekomst met behulp van GC-MS onderzocht zullen moeten worden.

Uitgegaan is van de in een eerder stadium ontwikkelde methode voor de bepaling van Diethylstilbestrol in runderurine.

Teneinde na te gaan of deze methode geschikt is als multimethode en zo neen welke modificaties toegepast dienen te worden zijn alle facetten van de eerder beschreven methode (81.61) nagewerkt.

Aanwijzingen, welke moeten leiden tot een zo'n uitgebreid mogelijke multimethode, worden gegeven.

Conclusie:

- a. Met de ontwikkelde methode is het mogelijk om naast DES ook Diethylstilbestrol en Hexoestrol aan te tonen.
- b. De voor de bepaling van DES in babyvoeding ontwikkelde methode (F 58) is, na invoering van enkele modificaties, toepasbaar voor de analyse van DES in mest.

- c. Uit een vergelijkend onderzoek is gebleken dat urinemonsters waarin met de RIA techniek een gehalte van 1 µg/liter of meer gemeten is met GCMS nader onderzocht dienen te worden.
- Bij aanwezigheid van Dienestrol en/of Hexestrol geeft de RIA techniek een vals positief DES resultaat. Met behulp van GCMS kan dit onderscheid wel gemaakt worden.
- d. De quantitative resultaten van de GCMS zijn onafhankelijk van de gebruikte berekeningsmethode.
- e. De gelpermeatiechromatografie is als primaire zuiveringsstap op het 1 ppb te prevaleren boven voorzuivering via seppack of extralute.
- Een vergroting van de uit te vangen fractie is noodzakelijk om alle genoemde hormonen te isoleren.
- f. Om de in dit verslag genoemde hormonen te zuiveren met de twee dimensionale HPLC is het noodzakelijk om het eluens van de 1e kolom in twee fracties naar de analytische kolom te transporteren.
- Het uitvangen van drie fracties na de analytische kolom is noodzakelijk.
- Fractie 1 bevat Estriol
- Fractie 2 bevat Zeranol en Trenbolon
- Fractie 3 bevat 17 β-estradiol, Hexestrol, Dienestrol, Diethylstilbestrol en Estron.
- g. Met uitzondering van zeranol en trenbolon zijn de overige anabole stoffen op dezelfde wijze als voor DES geldt, te derivatiseren.
- h. Gaschromatografie met behulp van een "fused silica" kolom met een chemisch gebonden polaire fase (b.v. Cp-sil 19 CB) is te prefereren boven de tot nu toe gebruikte (Apolaire Cp-sil 5) kolom.
- i. Gezien de analytische "Know how", welke in de loop der tijd is vergaard ten aanzien van de analyse in urine, is het aan te bevelen bij opsporingen uit te gaan van deze matrix en niet in de voor de monsternemer makkelijkere matrix mest.
-

Verantwoordelijk: ir L.G.M.Th. Tuinstra ✓
Medewerkers/samenstellers: W.A. Traag, H.J. Keukens
Projectleider: dr W.G. de Ruig

Inleiding:

In het najaar van 1980 kreeg het RIKILT de opdracht analysemethoden te ontwikkelen voor de bepaling van Diethylstilbestrol (DES) in urine op het 1 ppb niveau.

Binnen de afdeling Contaminanten werd een methode m.b.v. gaschromatografie-massaspectrometrie ontwikkeld, ter bevestiging van de resultaten van o.a. radio immuno-assay en dunnelaagchromatografische technieken.

Nadat de GC-MS methode voor de bepaling van DES in urine ontwikkeld was (intern voorschrift F 62), zijn een aantal andere groeibevorderende stoffen onderzocht. Naast het al eerder genoemde DES zijn nog twee andere chemisch nauw verwante verbindingen z.g.n. "stilbenen" onderzocht, alsmede enkele endogene en exogene hormonale verbindingen ontleend aan tabel I en aan de hand van literatuurgegevens (2, 3) welke zijn samengevat in tabel II.

Nagegaan is welke verbindingen simultaan met DES geanalyseerd konden worden of welke modificaties er eventueel noodzakelijk zouden zijn. Een en ander is, op beperkte schaal, uitgevoerd teneinde in de toekomst optredende problemen rond de analyse van groeibevorderende stoffen, anders dan DES, snel aan te kunnen pakken.

Aangezien met de GC-MS de uiteindelijke bepaling moet plaatsvinden wordt na een korte principe schets van de huidige DES methode voor urine begonnen met de GC-MS mogelijkheden te beschrijven waarna de zuivering aan de orde komt.

1. Onderzoek

De voor de bepaling van DES ontwikkelde methode (4) kan in het kort als volgt worden samengevat:

De testportie urine (25 ml) wordt gedurende een nacht bij 37°C gehydrolyseerd en vervolgens met ether geëxtraheerd. Het etherextract gewassen, met achtereenvolgens carbonaatbuffer en water, gedroogd en ingedampt. Het droge residu wordt opgenomen in tolueen/ethylacetaat (1:1 V/V) en dit extract wordt met behulp van vloeistofchromatografie over een gelpermeatie kolom gezuiverd. De DES-fractie van het eluaat wordt drooggedampt en opgenomen in acetonitril/water (1:1 V/V). Dit extract wordt met behulp van HPLC over twee in serie geschakelde "reversed phase" kolommen verder gezuiverd.

De trans-DES-fractie van het HPLC eluaat wordt na droogdampen gederivatieerd met n-heptafluorboterzuuranhydride. Het gevormde trans- en cis-DES-di-n-heptafluorbutyraat (DES-HFB, zie figuur 1) wordt bepaald en geïdentificeerd met laag oplossend vermogen, "multi ion", "electron impact" GCMS. Ter bepaling van het terugwinningspercentage wordt per analyseserie een representatieve testportie urine tot het niveau van 1 microgram DES per liter verrijkt met trans-DES of DES-monoglucuronide (DES-MG).

Om nu na te gaan of de ontwikkelde methode in deze vorm geschikt is voor de bepaling van de overige hormonen en zo nee welke modificaties nodig zijn, zijn de afzonderlijke facetten van de beschreven methode nagewerkt voor de overige anabolica.

2. Gaschromatografie-massaspectrometrie

Detectie m.b.v. de Finnigan 4000 quadrapool met mogelijkheden voor electron impact en chemische ionisatietechnieken, wordt voorafgegaan door een scheiding op een "fused silica" capillaire kolom. Injectie van 5 µl extract is splitloos (5). Doordat het DES molecuul twee OH groepen bevat moet allereerst gederivatieerd worden. Twee mogelijkheden werden door ons onderzocht. Allereerst derivatisering met trimethyl-chloorsilaan (TMCS) (6) waarbij een verbinding ontstaat met een moleculair gewicht van 412. Ook werd gederivatieerd met heptafluorboterzuuranhydride (HFBA) (7), waardoor het moleculair gewicht van het derivaat 660 werd. In fig. 2 is het totaal ionenstroomchromatogram van een met HFBA gederivatieerde DES standaard (ca. 5 ng DES) weergegeven. In fig. 3 het volledig spectrum van het HFB derivaat van trans-DES. In fig. 2 wordt de piek met scannummer 806 veroorzaakt door cis diethylstilbestrol en met scannummer 856 door de transverbinding, zijnde de biologisch meer actieve component (=DES). Het voorkomen van de cis- en transverbinding in het chromatogram wordt door sommigen als extra identificatiemogelijkheid aangevoerd (8). De onderlinge intensiteitsverhouding is afhankelijk van de omstandigheden, zowel in het dier als tijdens de gevolgde analyseprocedure (9). Dit laatste werd ook door ons waargenomen.

Bij gebruik van de beschreven methode wordt tijdens de HPLC zuivering alleen de trans-component geïsoleerd en met GCMS bepaald.

Met de Finnigan 4000 is het mogelijk onder routine omstandigheden met 5 ng DES na derivatiseren een volledig spectrum te verkrijgen van de transcomponent.

3. Derivatisering en GCMS ("Electron impact")

Om de onderzochte anabolica gaschromatografisch te kunnen scheiden is het noodzakelijk, evenals voor DES, om de aanwezige hydroxylgroepen te derivatiseren.

De derivatisering met Heptafluorboterzuuranhydride (HFBA) is dan ook uitgevoerd met een mengsel van de acht componenten, waarna het mengsel geanalyseerd is onder dezelfde omstandigheden als voor de bepaling van DES (Cp-sil 5 kolom).

Uiteraard is wel het scan bereik van de massaspectrometer aangepast zodat het theoretisch te verwachten derivaat van zeranol (molecuulion M/z 910) gedetecteerd kon worden.

In fig. 4 is het totaal ionenstroom chromatogram weergegeven en in fig. 5 a t/m 5 h zijn de spectra weergegeven. In bijlage 1 zijn mogelijke fragmentatiepatronen aangegeven voor de stilbenen.

Uit fig. 4 blijkt dat er nauwelijks scheiding is tussen DES, DIE en HEX. Het verschil in retentietijd bedraagt tussen de toppen van DIE en HEX 3 seconden en tussen HEX en DES 2 seconden. Alleen wanneer DIE, HEX en DES op ongeveer gelijk niveau aanwezig zijn, kunnen de spectra goed geïnterpreteerd worden.

Enkele voorbeelden: massa 303, in HEX een sterk fragment, is eveneens in het spectrum van DES aanwezig.

Ook kan het molecuulion van DES M/z 660 bij aanwezigheid van een relatief grote hoeveelheid Dienoestrol geïnterfereerd worden door de $M^+ + 2$ isotoop van DIE. Deze interferenties zouden problemen kunnen opleveren bij een relatief grote hoeveelheid van één van de componenten. Om deze mogelijk optredende problemen te voorkomen werd getracht om de gaschromatografische scheiding te verbeteren. Analyse op een meer polaire kolom (Cp-sil 19 CB) geeft een basislijn scheiding voor zes componenten (zeranol en trenbolon zijn nog niet onderzocht).

In fig. 6 is het totaal ionenstroom chromatogram gegeven. Het toepassen van een capillaire kolom gecoat met Cp-sil 19 is, gezien het betere scheidende vermogen aan te bevelen.

Uiteraard moeten enkele belangrijke aspecten zoals lineair gedrag, mogelijke interferentie vanuit de matrix en levensduur van de kolom nog bestudeerd worden.

De derivatisering alsmede de gaschromatografie massaspectrometrie levert voor Diethylstilbestrol, Dienestrol, Hexestrol, 17 β -Estradiol, Estron en Estriol goede resultaten op.

Het niveau waarop metingen verricht kunnen worden (alleen nog maar standaarden geanalyseerd) ligt op hetzelfde niveau als bij Diethylstilbestrol.

De derivatisering van Trenbolon en Zeranol levert nog problemen op. Aan de hand van de intensiteit van de piek (zie fig. 4) kan geconcludeerd worden dat er slechts weinig stof gederivatiseerd is, waardoor slechte spectra verkregen worden.

Uit de spectra voor zeranol en in mindere mate voor trenbolon blijkt ook dat niet alle hydroxylgroepen gederivatiseerd zijn.

Het afschermen van de keto groep door middel van derivatisering tot een oxim ($>C = N-OH$) gevolgd door derivatisering met HFBA lijkt een goede mogelijkheid.

Normaal bestaat er een keto \rightleftharpoons enol evenwicht dat de derivatisering bemoeilijkt. Door nu de keto om te zetten in een oxim wordt deze moeilijkheid voorkomen. Deze derivatisering moet nog uitgevoerd worden. Naast het gebruikte derivatiseringsreagens (HFBA) zijn enkele andere derivatiseringsreagentia onderzocht, o.a. TMS. Belangrijk is het feit dat het TMS derivaat van DES, HEX en DIE te weinig structuur afhankelijke fragmenten geeft om een betrouwbare identificatie te verrichten. Om een spectrum van een bepaalde component b.v. DES te kunnen onderscheiden van de spectra van ca. één miljoen andere componenten zijn, mits de relatieve intensiteit voldoende groot is, tenminste 4 fragment ionen noodzakelijk (10).

Het TMS derivaat is, bij de meting met laag oplossend vermogen machines, niet geschikt.

Een mogelijke verbetering voor het verkrijgen van het HFB derivaat zou bereikt kunnen worden door uit te gaan van Heptafluorboterzuurimidazol (HFBI) (11). Hierbij blijft als bijproduct het inerte imidazol over, in tegenstelling tot HFBA waar boterzuur overblijft als bijproduct, wat volgens sommige deskundigen problemen zou kunnen opleveren.

Er is door ons geen verschil waargenomen tussen derivatisering met HFBA en HFBI. Wel is de respons bij gebruikmaking van HFBI ca. 20% lager.

GC-MS (chemische ionisatie)

De hierboven beschreven massaspectrometrische analyses zijn uitgevoerd in de "electron impact mode".

Hierbij vindt ionisatie plaats door het beschieten van de te onderzoeken stof met electronen.

Ook kan ionisatie plaats vinden langs chemische weg. Hiertoe wordt een constante hoeveelheid reactiegas via een naaldventiel toegevoerd in de bron. Na ionisatie van het reactiegas door electronen volgt een kettingreactie met de te onderzoeken stof. Door deze mildere ionisatie treedt minder fragmentatie op, resulterend in een makkelijker te interpreteren spectrum alsmede een gevoeligheidswinst.

Tot nu toe zijn voor diverse hormonen enkele experimenten uitgevoerd waarbij als reactiegas zowel methaan, isobutaan als ammoniak is toegepast. De resultaten zijn nogal teleurstellend.

Met methaan werd voor de positieve ionen spectra verkregen welke een iets lagere gevoeligheid geven dan met "EI" wordt verkregen. Voor wat betreft de spectra van de negatieve ionen valt op te merken dat voornamelijk een signaal verkregen wordt met M/z 197, zijnde het anion $C_3F_7-C=O^-$. Ook kon geen significante verbetering bereikt worden door gebruik te maken van de andere reactiegassen.

Een rol hierbij speelt de overdracht van energie welke ondermeer afhankelijk is van de druk in de "ion source". Ideaal zou een voordruk van ongeveer 1 torr zijn, echter met de Finnigan 4000 is slechts een voordruk van 0,4 torr mogelijk. Boven deze druk treedt de automatische beveiliging in werking en wordt de machine uitgeschakeld.

4. HPLC voorscheiding

De twee dimensionale HPLC zuivering is nagewerkt voor de overige anabolica, onder dezelfde omstandigheden als voor DES.

In fig. 7 is het elutiepatroon van de acht onderzochte anabole steroiden schematisch aangegeven, na analyse op de 1e kolom.

Uit dit schema blijkt dat onder de toegepaste omstandigheden m.u.v.

Estriol alle componenten zich in dezelfde fractie bevinden zodat ze in één stap op de analytische kolom overgebracht kunnen worden.

Estriol zou in een eerdere fractie naar de analytische kolom getransporteerd kunnen worden. Een bezwaar is dat deze fractie, naar het zich laat aanzien, meer matrix bevat.

In fig. 8 is het elutieschema weergegeven voor de acht componenten over de analytische kolom (Estriol is in een eerdere fractie op de kolom gebracht).

Uit fig. 8 blijkt dat naast DES ook HEX, DIE en Estron in een en dezelfde fractie elueren.

De overige componenten elueren eerder en kunnen eventueel in twee fracties uitgevangen worden, nl. trenbolon, zeranol en β -estradiol enerzijds en estriol anderzijds.

Ook nu weer bestaat de indruk dat deze fracties meer matrix bevatten dan de DES bevattende fractie.

In de lit. (12) wordt melding gemaakt van scheiding tussen DES, DIE en HEX m.b.v. HPLC hetgeen door ons tot nu toe nog niet bereikt is.

Zou deze scheiding wel bewerkstelligd kunnen worden dan is het te verwachten dat er ook een betere scheiding optreedt tussen de overige componenten.

Een verbeterde scheiding heeft tot gevolg dat de grootte van elke fractie verkleind kan worden, waardoor per fractie slechts één component aanwezig is, waardoor de methode nog specifiekere wordt. Van een multimethode is dan natuurlijk geen sprake meer, hetgeen nadelig is i.v.m. bevestiging van RIA resultaten, immers het bij de RIA gebruikte antilichaam geeft kruisreacties met andere hormonen dan DES. Gezien echter de goede scheidingen op de capillair is er geen grote behoefte om op de HPLC een betere scheiding te bewerkstelligen.

5. Zuivering

a. Gelpermeatie chromatografie:

Gelpermatie chromatografie is een techniek waarbij scheiding plaatsvindt op grond van molecuulgrootte.

Relatief kleine moleculen ($MW < 500$) worden door de poriën van het kolommateriaal gedwongen een langere weg af te leggen dan grotere moleculen waardoor er verschil in retentietijd optreedt.

Het GPC gedrag van de in tabel II genoemde stoffen is schematisch weergegeven in fig. 9.

In fig. 9 is tevens aangegeven de "window" d.w.z. de grootte van de fractie welke aangehouden wordt voor het uitvangen van DES. Het is gebleken dat Hexestrol en Dienestrol vrijwel in dezelfde fractie elueren als DES. Voor een 100% recovery van de overige componenten dient deze "window" vergroot te worden, hetgeen een verhoging van de matrix bijdrage ten gevolge kan hebben.

B. Extralute:

Alhoewel de GPC voorzuivering voor de bepaling van DES in runderurine zijn waarde bewezen heeft, zijn er pogingen ondernomen om deze toch wel tijdrovende stap te vervangen door een andere voorzuivering.

Bij extralute kolommen vindt extractie en clean-up in één stap plaats (13).

Op de kolom wordt 20 ml gehydrolyseerde urine gebracht (15 ml urine + 5 ml H₂O) en aansluitend geëluëerd met 80 ml ether. De etherfase wordt afgedampt en het residu opgenomen in acetonitril: H₂O (1:1 V/V) waarna de verdere opwerking plaats vindt volgens (4) vanaf de tweedimensionale HPLC.

Enkele experimenten met DES, DIE en HEX in urine zijn uitgevoerd. Er treden geen noemenswaardige verliezen op. Echter de zuiverheid van de extracten is iets minder dan die verkregen met GPC.

De methode is daarom alleen geschikt bij monsters met hogere gehalten aan hormonen (b.v. 5 ppb en hoger).

C. Seppack

De seppack kolommetjes, welke bestaan uit reversed phase C18 materiaal (analoog aan HPLC materiaal) worden ook toegepast als hulpmiddel voor de extractie en clean-up in één stap. Door de seppack kolom werd m.b.v. een injectiespuit een bekende hoeveelheid gehydrolyseerde (20 ml) urine geperst. Daarna werd in tegenstroom het aanwezige DES van het kolommetje geëluëerd met 2 ml acetonitril. Na droogdampen werd het residu opgenomen in acetonitril-H₂O (1:1 V/V) en werd het tot nu toe gebruikte voorschrift verder gevolgd vanaf de tweedimensionale HPLC. Alhoewel ook bij dit systeem geen noemenswaardige verliezen optraden kan dit systeem, gezien de onzuiverheid van het extract, de tot nu toe gebruikte extractie en GPC zuivering niet vervangen op het lage 1 ppb niveau.

D. Additionele zuiveringsmethode:

Een additionele zuiveringsstap waarbij sulfaat verwijderd wordt door toevoeging van bariumchloride (11) aan de urine is uitgevoerd.

Alhoewel er een neerslag zichtbaar werd, had dit geen positief gevolg voor de bepaling.

De in de methode beschreven zuiveringsstappen bleken bij toepassing van bariumchloride toch noodzakelijk te zijn.

Onderzoek naar DES in andere matrices:

In verband met de monsternamen werd de vraag gesteld of een methode ontwikkeld kon worden voor de bepaling van DES in mest. Uiteraard vereist mest een geheel andere aanpak dan urine. De voor de bepaling van DES in kindervoeding ontwikkelde methode (14) is met een kleine modificatie toegepast voor enkele monsters mest.

De modificatie behelst het volgende: i.p.v. extractie met ether en de daarop volgende centrifugering is, i.v.m. de veiligheid, geëxtraheerd met chloroform en aansluitend is de in (14) beschreven methode gevolgd. De resultaten zijn redelijk goed; de recovery schommelt rond de 50 à 60%. Opgemerkt dient te worden dat slechts enkele experimenten uitgevoerd zijn.

5. Resultaten

In RIKILT verslag 81.92 (10) zijn voor DES, DIEN en HEX enkele gegevens gerapporteerd met betrekking tot reproduceerbaarheid van zowel retentietijden als van de relatieve intensiteit van de ionen, de lineariteit etc. met het accent op DES.

Ook zijn criteria genoemd waaraan het spectrum van een piek in een monster op een retentietijd overeenkomend (\pm 10 seconden) met standaard trans DES moet voldoen voor een positieve identificatie. Met de beschreven methode (4, 10) is in het kader van de Werkgroep Evaluatie van Analysetechnieken voor Hormonen (EVATH) een vergelijkend onderzoek uitgevoerd.

Vijftig monsters (geselecteerd door het RIV) zijn met de beschikbare analysetechnieken onderzocht.

In tabel III zijn de resultaten gegeven voor alleen die monsters welke met GC-MS positief bevonden zijn t.o.v. de RIKILT-RIA resultaten.

Hieruit blijkt dat de GC-MS resultaten onafhankelijk zijn van de gebruikte berekeningswijze.

In tabel IV zijn de resultaten van alle monsters gegeven en wel gerangschikt naar toenemend gehalte m.b.v. de RIA-techniek.

De resultaten van dit ringonderzoek worden elders (15) gepubliceerd. Het blijkt dat het zinvol is bij RIA-resultaten vanaf ca. 1 ppb de monsters nader te onderzoeken met GC-MS. Verder bleek dat een aantal monsters door de RIA techniek positief bevonden werden, terwijl GC-MS onderzoek de aanwezigheid van hexastrol of dienolestrol aantoonde.

Conclusie:

- a. Met de ontwikkelde methode is het mogelijk om naast DES ook Dien-
estrol en Hexastrol aan te tonen.
- b. De voor de bepaling van DES in babyvoeding ontwikkelde methode
(F 58) is, na invoering van enkele modificaties, toepasbaar voor de
analyse van DES in mest.
- c. Uit een vergelijkend onderzoek is gebleken dat urinemonsters waar-
in met de RIA techniek een gehalte van 1 µg/liter of meer gemeten
is met GCMS nader onderzocht dienen te worden.
Bij aanwezigheid van Dienestrol en/of Hexestrol geeft de RIA tech-
niek een vals positief DES resultaat. Met behulp van GCMS kan dit
onderscheid wel gemaakt worden.
- d. De kwantitatieve resultaten van de GCMS zijn onafhankelijk van de
gebruikte berekeningsmethode.
- e. De gelpermeatiechromatografie is als primaire zuiveringsstap op het
1 ppb te prevaleren boven voorzuivering via seppack of extralute.
Een vergroting van de uit te vangen fractie is noodzakelijk om alle
genoemde hormonen te isoleren.
- f. Om de in dit verslag genoemde hormonen te zuiveren met de twee
dimensionale HPLC is het noodzakelijk om het efluent van de 1e ko-
lom in twee fracties naar de analytische kolom te transporteren.
Het uitvangen van drie fracties na de analytische kolom is noodza-
kelijk.

Fractie 1 bevat Estriol

Fractie 2 bevat Zeranol en Trenbolon

Fractie 3 bevat 17 β-estradiol, Hexestrol, Dienestrol, Diethylstil-
bestrol en Estron.

- g. Met uitzondering van zeranol en trenbolon zijn de overige anabole stoffen op dezelfde wijze als voor DES geldt, te derivatiseren.
- h. Gaschromatografie met behulp van een "fused silica" kolom met een chemisch gebonden polaire fase (b.v. Cp-sil 19 CB) is te prefereren boven de tot nu toe gebruikte Apolaire (Cp-sil 5) kolom.
- i. Gezien de analytisch "Know how" welke in de loop der tijd is vergaard ten aanzien van de analyse in urine, is het aan te bevelen bij opsporingen uit te gaan van deze matrix en niet in de voor de monsternemer makkelijkere matrix mest.

Toekomstig werk

1. Verbeteren van de derivatisering van zeranol en trenbolon. Hiertoe is een korte literatuurstudie noodzakelijk.
2. Nagegaan dient te worden in welke vorm (vrij of gebonden) de onderzochte anabolica in urine voorkomen. Dit i.v.m. de tot nu toe gebruikte hydrolyse met *Helix pomatia*. Hiertoe is een korte literatuurstudie noodzakelijk.
3. Nagaan of de onderzochte anabolica met de tot nu toe gevolgde extractiemethode uit urine extraheerbaar zijn. Literatuurstudie. Tevens dient nagegaan te worden wat de invloed is van de vergroting van de GPC en HPLC uitvang fracties alsmede de mogelijkheid van het samenvoegen van de 1e en 3e HPLC fractie.
4. Grootheden zoals reproduceerbaarheid van het spectrum zowel van standaarden als in monsters; lineariteit etc. dienen onderzocht te worden teneinde te komen tot enkele criteria voor het afgeven van een positieve identificatie (zie ook 10).
5. Bij de GC-MS bepaling is het mogelijk om door een procedure voor elke stof de optimale massaspectrometrische instelling op tijdbasis te laten veranderen.

Dit impliceert dat telkens wanneer een bepaald hormoon van de GC kolom elueert die massa's gemeten worden welke voor dit hormoon relevant zijn. Teneinde te voorkomen dat een vals negatieve uitslag gegeven wordt, veroorzaakt door plotselinge verschuiving van de retentietijd, is het noodzakelijk dat er gewerkt wordt met een interne standaard. Als interne standaard kan het best gebruik gemaakt worden van een gelabeld hormoon.

Daar de analyse zich tot nu toe toespitst op de analyse van DES wordt aanbevolen te werken volgens de methode van isotoopverdunding met gelabeld DES.

Op korte termijn dient de mogelijkheid om als interne standaard 2-methoxy-estradiol toe te passen, nagewerkt te worden.

6. Nagaan wat de mogelijkheden zijn bij de combinatie van extralute en natriumcarbonaat zuivering e.e.a. ter vereenvoudiging van de methode.

7. Naast de in dit verslag genoemde oestrogene anabolica worden in de praktijk ook androgene anabolica gebruikt.

Deze laatste groep van verbindingen, welke op grond van chemisch/fysische eigenschappen niet in aanmerking komen om simultaan met DES te worden gedetecteerd, verdient in de toekomst zeker aandacht. In dit verband kan gedacht worden aan selectieve ion pair extractie methoden, die t.z.t. ingebouwd kunnen worden in de gebruikte methode.

Literatuur

1. EVATH rapport: Vergelijkend onderzoek in Nederland naar de aantoonbaarheid van Diethylstilbestrol (DES) in kalver- en runderurine door middel van verschillende chemische methoden, Juli 1982.
2. Verbeke R.: Journal of Chromatography 177 (1979) 69-84.
3. Stan H.J.: Chemie für Labor und Betrieb 30, 1979 (4) 133-138.
4. Tuinstra L.G.M.Th., Traag W.A., Keukens H.J.: De Ware(n)-Chemicus 11 (1981) 129-140.
5. Tuinstra L.G.M.Th.; Traag W.A.: J. High Resol. Chromatogr. 1979, 2, 723-728.
6. Stan H.J.; Abraham B.: J. Chromatogr. 195 (1980), 231-241.
7. Blau K.; King G.S.: Handbook of derivatives for chromatography, Heyden London.
8. Ryan J.J.; Pilon J.C.: Journal of the AOAC vol. 59 (1976), 817-820.
9. Winkler V.W.; Nijman M.A.; Egan R.S.: Steroids 17 (1971) 197-207.
10. RIKILT-verslag 81.92: Interpretatie van GC-MS resultaten van de bepaling van diethylstilbestrol in runderurine.
11. Persoonlijke mededeling: H. Diederik, Zoölogisch laboratorium, Universiteit Utrecht.
12. Jansen E.H.J.M.; Van den Berg R.N.; Both-Miedema R.; Van Blitterswijk H.; Stephany R.W.
RIV rapport no. 367910002, december 1981.

13. Extralute Merck.

14. Intern RIKILT voorschrift F 58:

De bepaling van diethylstilbestrol in babyvoeding, kalfs- en rund-
vlees op het 1 ppb niveau met behulp van gaschromatografie-massa-
spectrometrie, d.d. 1981-04-29.

15. Resultaten ringonderzoek (mei 1982) zullen na evaluatie aan de
Werkgroep EVATH gerapporteerd worden.

Tabel I. Bestanddelen van anabole preparaten met hormonale werking.

1. Lichaamseigen anabolica of esters hiervan

Steroiden

17 β -estradiol en esters

Estriol

Estron

testosteron en esters

progesteron

2. Niet-lichaamseigen anabolica

Steroiden

17 α -ethynylestradiol

17 α -methyltestosteron

medroxyprogesteron en esters

melengestrol en esters

17 β -Trenbolon (als acetaat)

Stilbeenderivaten

trans-diethylstilbestrol en esters

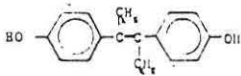
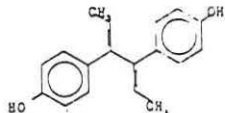
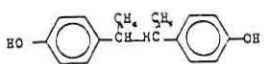
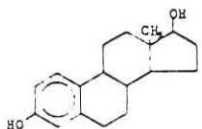
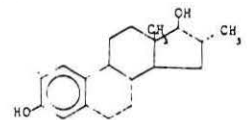
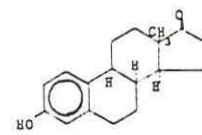
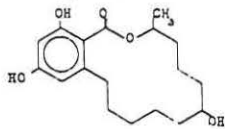
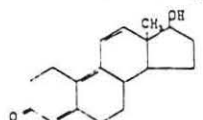
alfa dienestrol en esters

meso-hexestrol en esters

Mycotoxinederivaat

Zeranol = zearalanol

Tabel II. Voor onderzoek in aanmerking komende groeibevorderende stoffen.

Naam	bruto structuur	structuur formule	mol gew.	fragment ionen (na HFBA derivat.)
Diethylstilbestrol (DES)	$C_{18} H_{20} O_2$		268	660,631,447,417,341, 303
Dienestrol (DIE)	$C_{18} H_{18} O_2$		266	658,643,629,461,445
Hexestrol (HEX)	$C_{18} H_{22} O_2$		270	331,303
17 β -Estradiol	$C_{18} H_{24} O_2$		272	664,451,409,368,356 237
Estriol	$C_{18} H_{24} O_3$		288	876,663,449,368,236
Estron	$C_{18} H_{22} O_2$		270	466,448,442,409,368, 356,253
Zeranol	$C_{18} H_{26} O_5$		322	{ derivatisering nog niet geoptimaliseerd
Trenbolon	$C_{18} H_{22} O_2$		270	

Tabel III. Met GC-MS positief bevonden monsters uit een serie van vijftig urinemonsters.

code	RIKILT	result. RIA *1	GC-MS resultaat in µg/l *2		
nummer	nummer	µg/l	A	B	C
A 6	16146	0,40	1,0	0,9	0,9
A 7	16147	1,20	0,9	0,9	0,9
A 9	16149	0,49	0,6	0,6	0,6
A10	16150	0,87	0,6	0,6	0,6
A11	16151	3,70	3,3	3,3	3,4
A12	16152	1,44	1,8	1,8	1,7
A13	16153	0,41	0,7	0,6	0,7
A15	16155	2,01	1,8	1,7	1,7
A17	16157	0,21	0,7	0,6	0,6
A22	16162	0,47	0,8	0,8	0,8
A23	16163	0,64	0,7	0,7	1,1
A24	16164	0,47	0,6	0,9	0,7
A28	16168	2,63	2,0	2,0	1,8
A31	16171	1,04	1,2	1,1	1,0
A32	16172	0,61	1,0	1,3	1,1
A34	16174	0,97	0,6	0,7	0,7
A35	16175	0,26	0,5	0,8	0,6
A42	16182	0,47	0,9	0,4	0,5
A48	16188	1,08	0,8	0,7	1,0
A49	16189	0,56	1,0	0,7	1,1
A50	16190	1,05	1,6	1,0	1,5

*1 = RIA resultaten van het RIKILT verkregen na voorzuivering met Celite

*2 = Niet gecorrigeerd voor recovery

A = Gehalte berekend a.d.h. van piekhoogte uit het totaal ionenstroom chromatogram (TIC)

B = Gehalte berekend a.d.h. van piekhoogte M/z 660

C = Gehalte berekend a.d.h. van piekoppervlak TIC (na enhancement)

Tabel IV. RIKILT ringonderzoek DES in runderurine juni 1982

RIV volg nummer	RIA	GCMS *1
34	0	< 0,5
49	0	< 0,5
44	0,02	< 0,5
20	0,02	< 0,5
9	0,03	< 0,5
50	0,05	< 0,5
25	0,06	< 0,5
31	0,07	< 0,5
13	0,10	< 0,5
3	0,17	< 0,5
23	0,20	0,8
41	0,21	0,8
14	0,22	< 0,5
7	0,26	0,8
32	0,27	< 0,5
1	0,28	< 0,5
30	0,36	< 0,5
33	0,38	< 0,5
35	0,40	1,1
15	0,41	0,9
4	0,47	0,6
8	0,47	0,9
19	0,49	0,8
10	0,50	< 0,5
5	0,50	< 0,5
17	0,51	1,0
26	0,56	1,4
42	0,59	< 0,5
21	0,61	1,4
36	0,64	1,4
18	0,73	< 0,5
27	0,76	< 0,5
11	0,81	< 0,5 (H)
16 (H)	0,87	< 0,5 (H)
38	0,97	0,9
39	1,04	1,3
12	1,05	1,9
2 (D)	1,06	< 0,5
40	1,08	1,3
6 (D)	1,10	< 0,5 (D)
28	1,18	< 0,5
24	1,20	1,1
22	1,20	1,5
29	1,44	1,5
37 (H)	1,72	< 0,5 (H)
47	2,01	2,1
45 (D)	2,24	< 0,5 (D)
46	2,63	2,3
43 (H)	3,59	2,4 (H)
48	3,70	1,5

*1 = Resultaten gecorrigeerd
voor de gemiddelde
recoverie (recoverie > 80%)

Fig. 1: Structuur van Diethylstilbestrol na derivatiseren met HFBA.

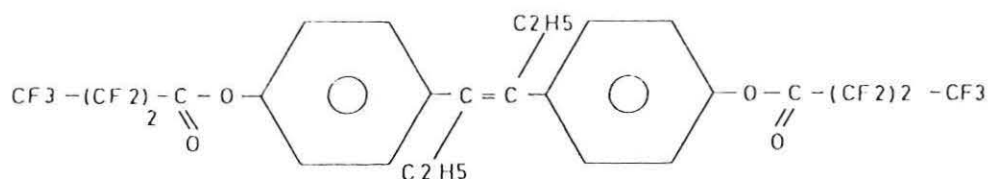


Fig. 2: Totaal ionenstroomchromatogram standaard Diethylstilbestrol na derivatiseren met HFBA, na voorscheiding via een Cp-sil 5 capillaire kolom.

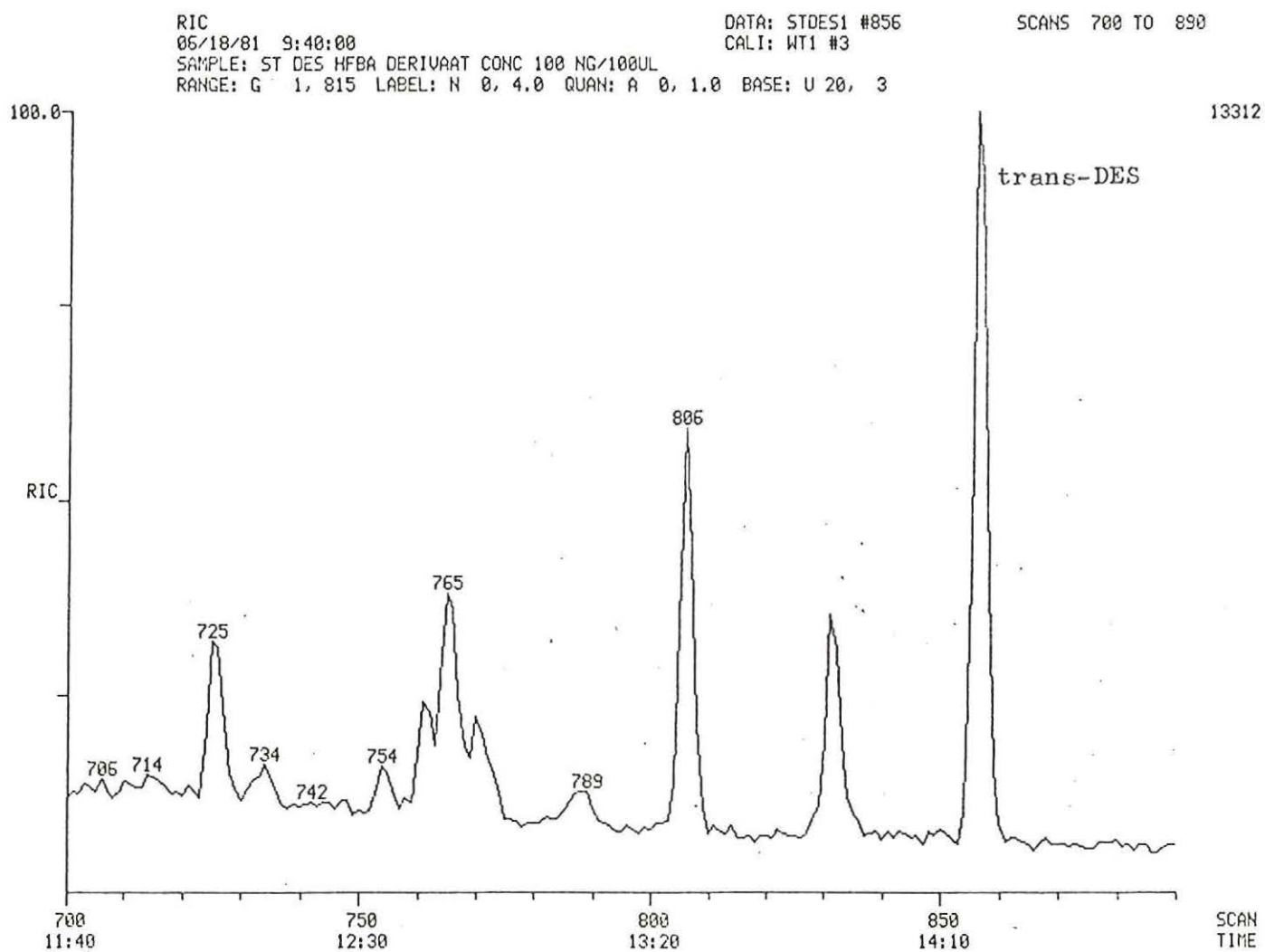


Fig. 3: Massaspectrum trans-Diethylstilbestrol HFB derivaat.

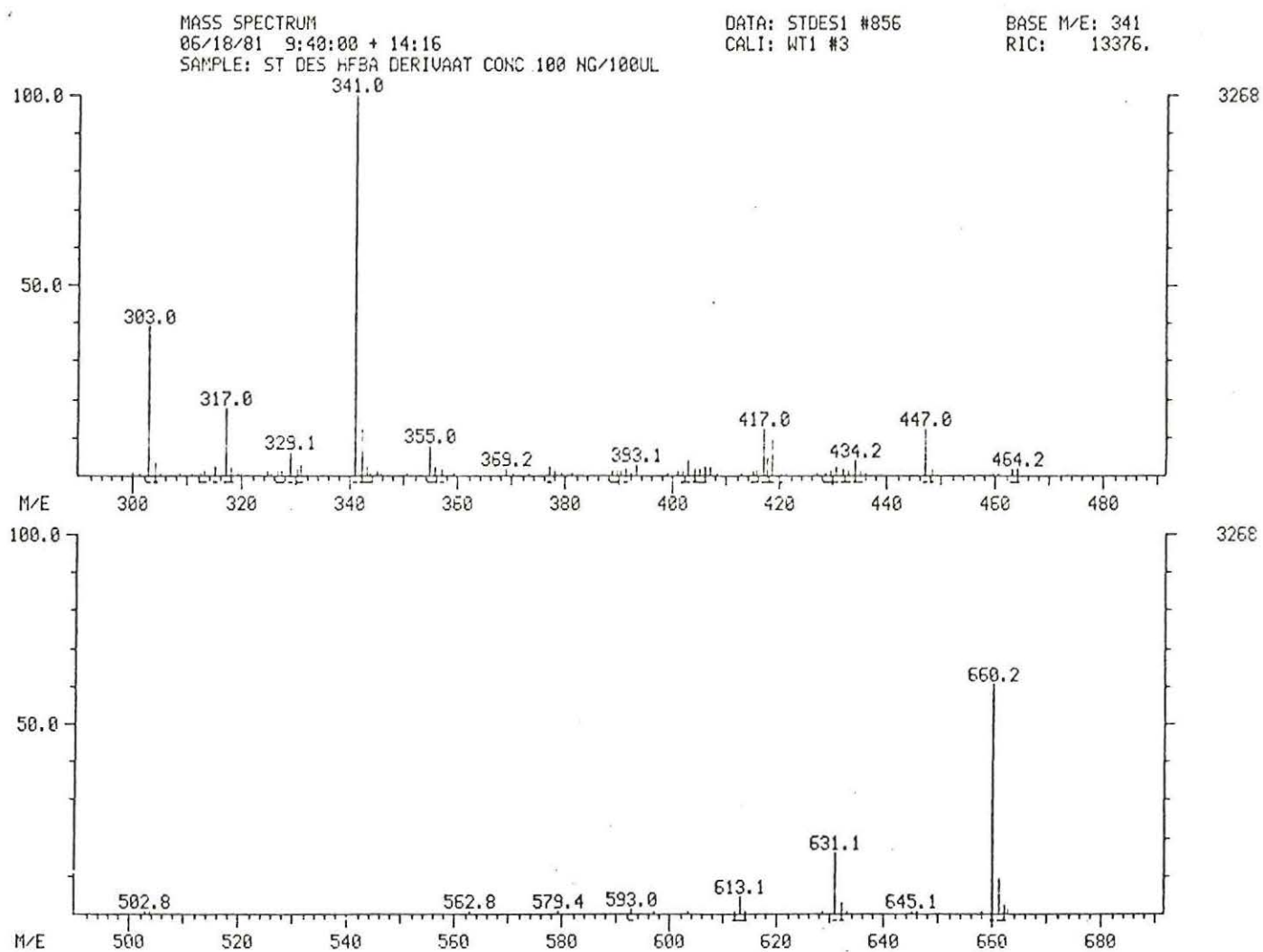


Fig. 4: Totaal ionenstroomchromatogram van acht anabole stoffen, na voorscheiding
via een Cp-sil 5 capillaire kolom.

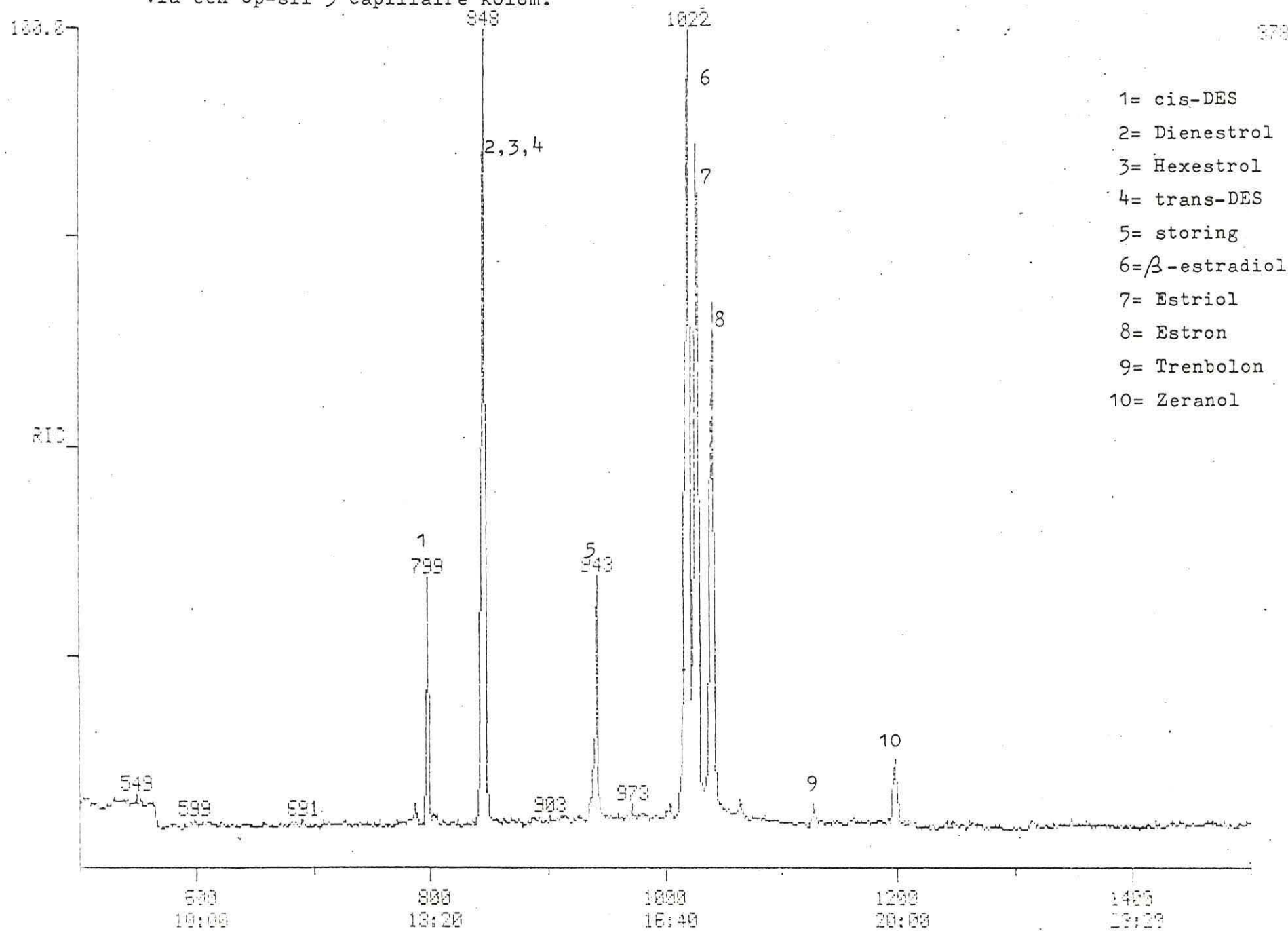


Fig. 5a: Massaspectrum Dienestrol HFB derivaat.

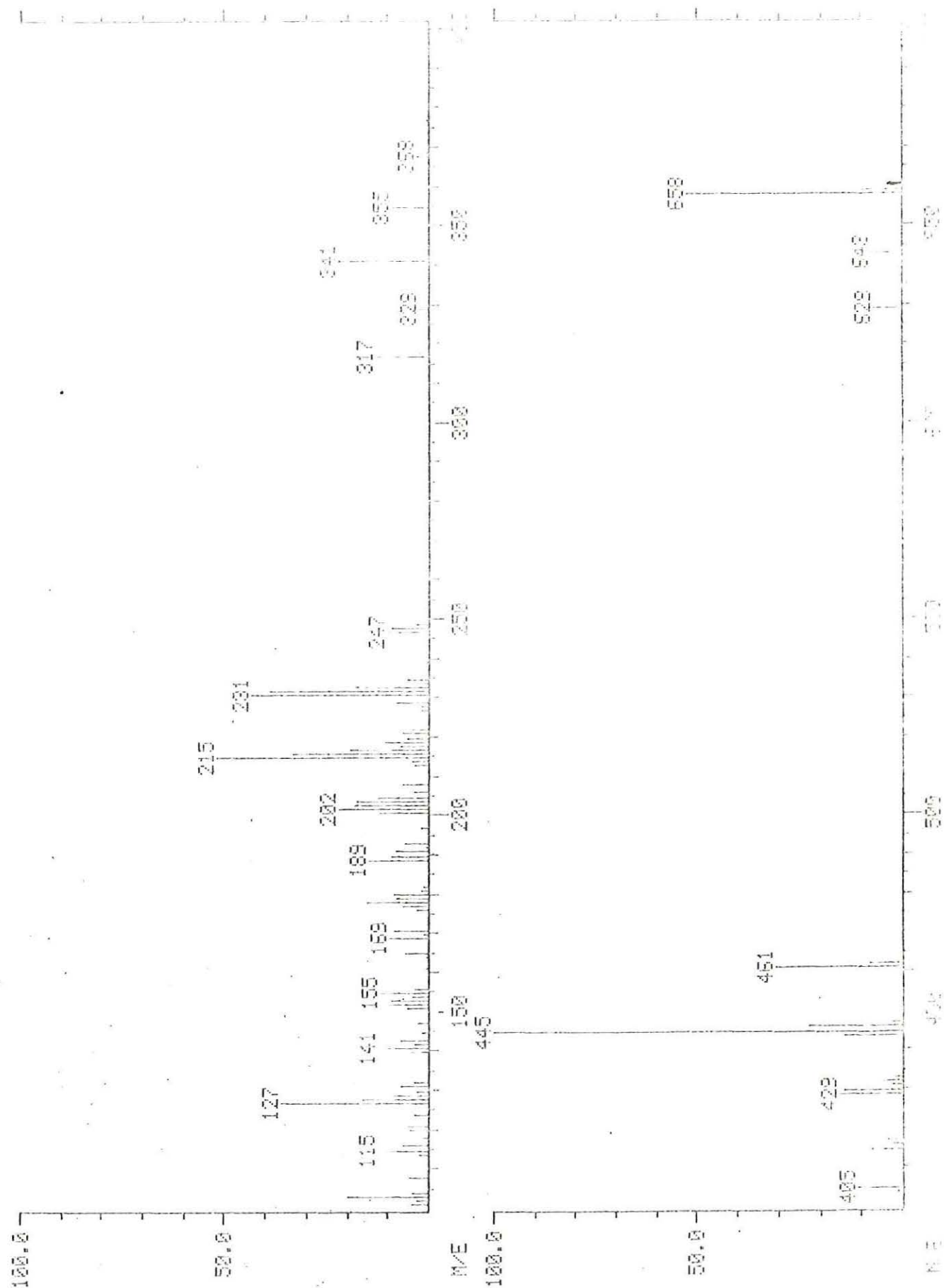


Fig. 5b: Massaspectrum Hexestrol HFB derivaat.

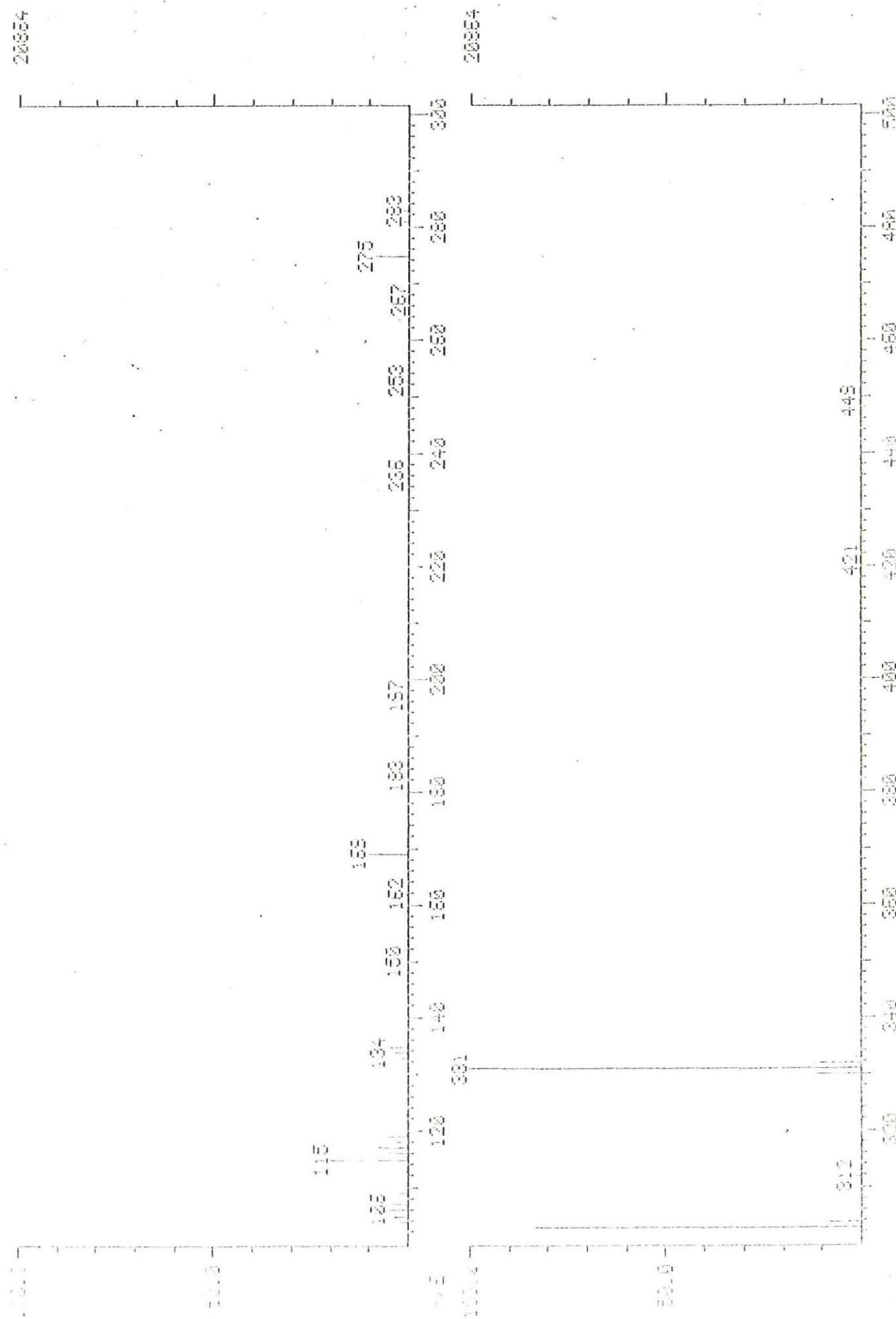


Fig. 5c: Massaspectrum trans-Diethylstilbestrol HFB derivaat.

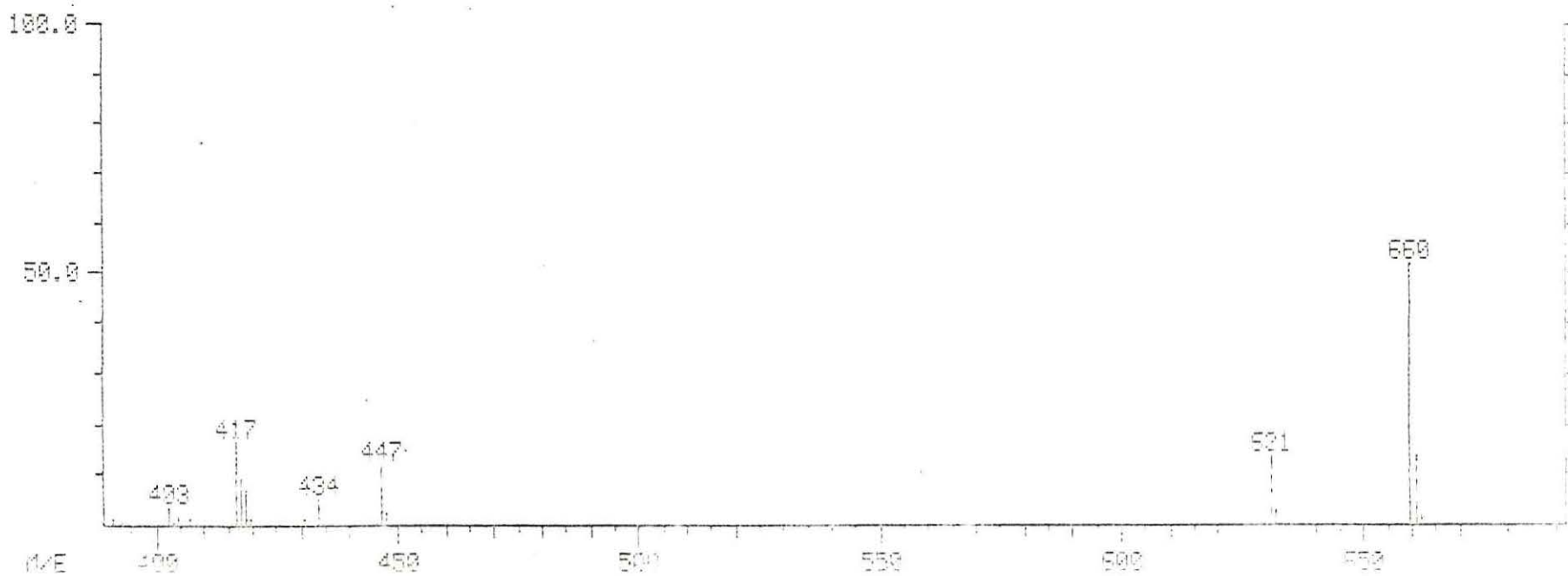
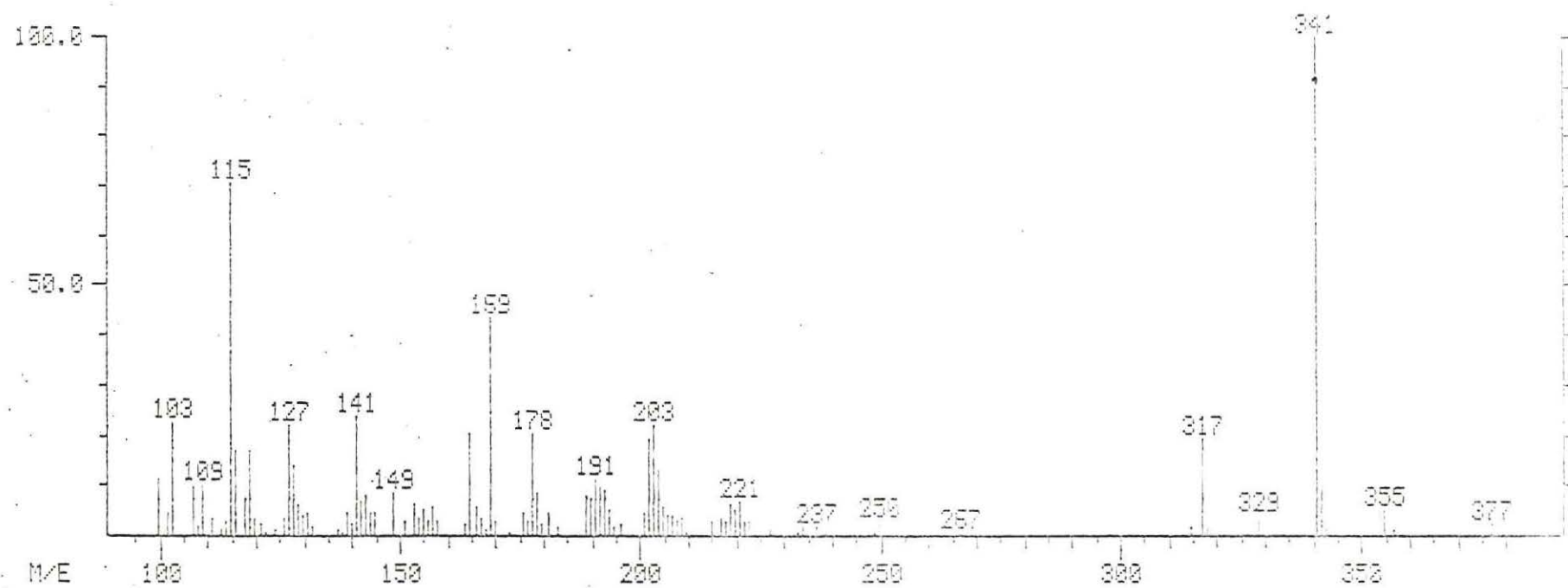


Fig. 5d: Massaspectrum 17 β -estradiol HFB derivaat.

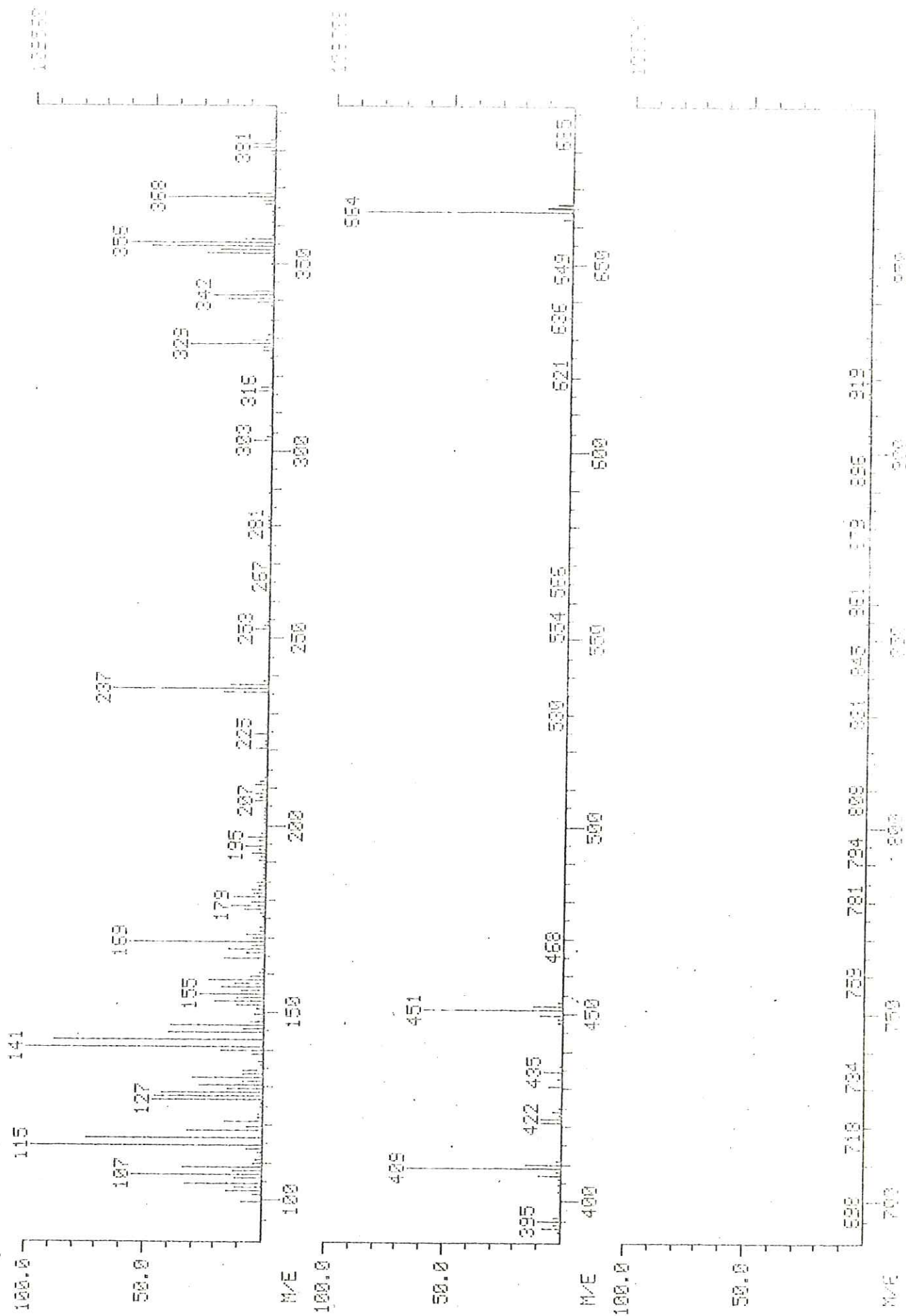


Fig. 5e: Massaspectrum Estriol HFB

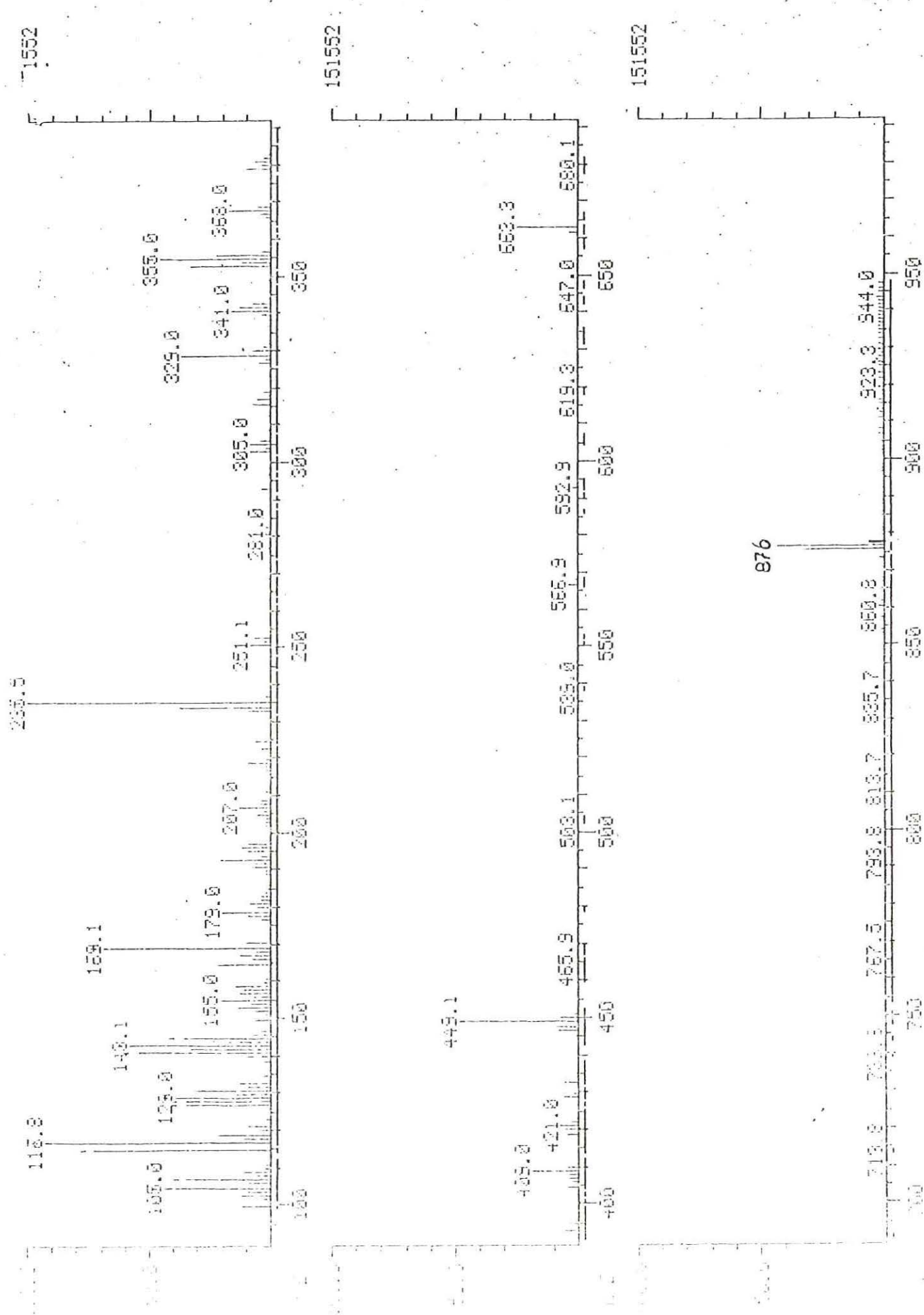
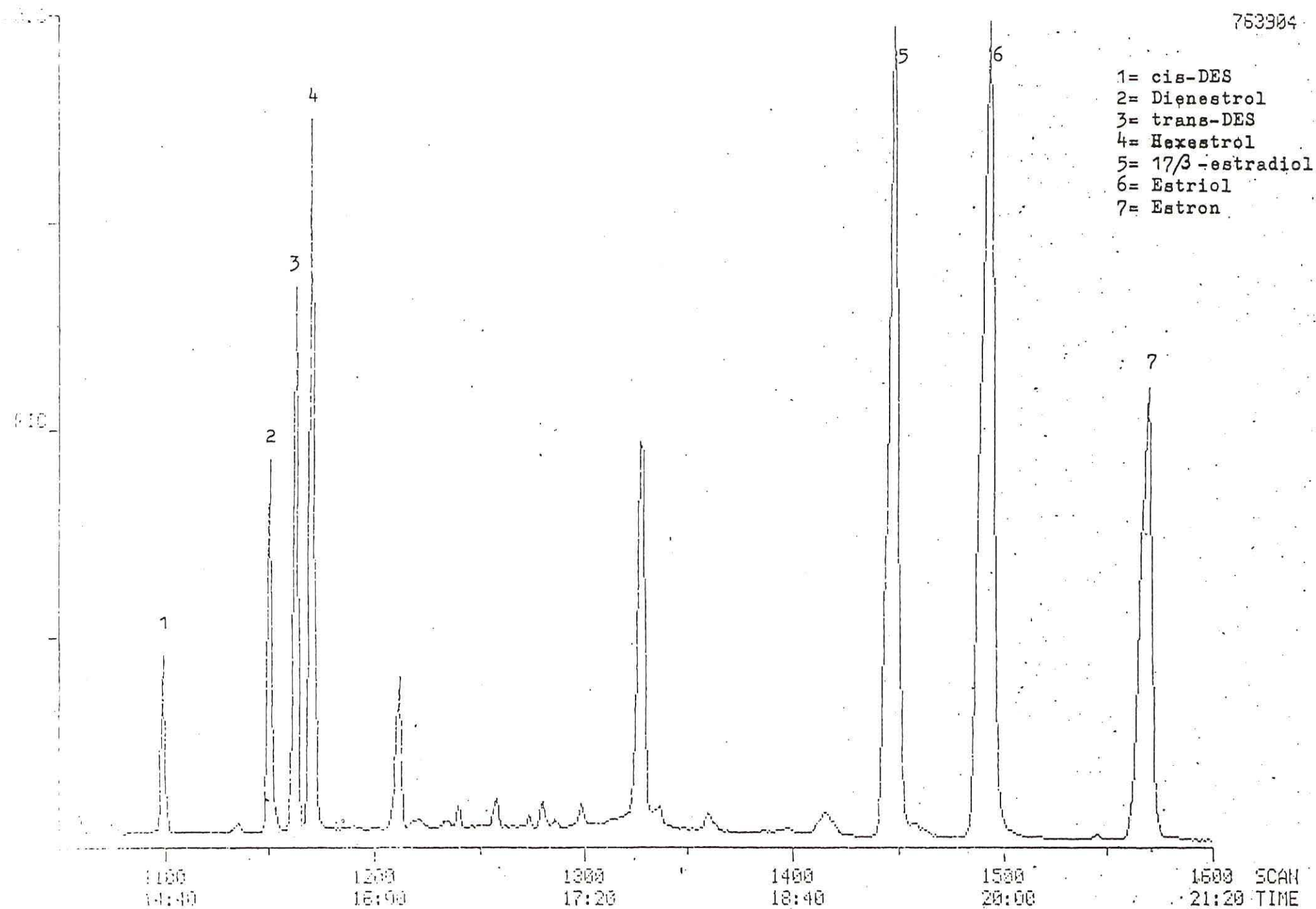
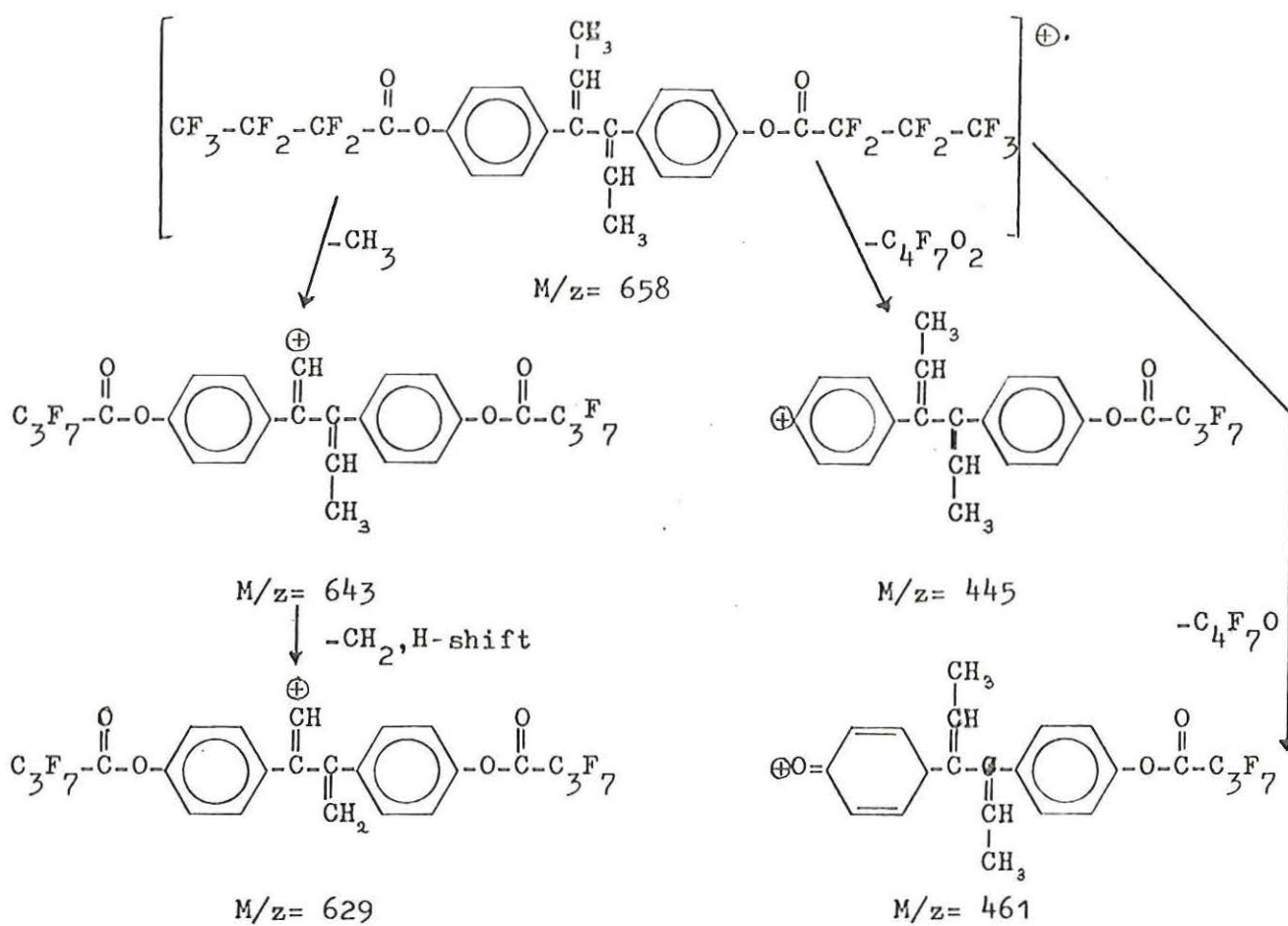


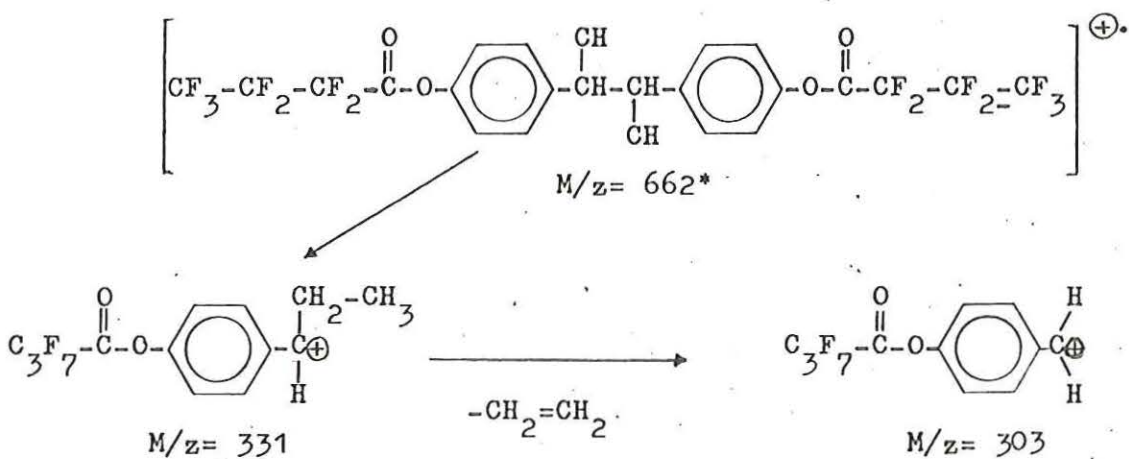
Fig. 6: Totaal ionenstroomchromatogram van zes anabole stoffen na voorscheiding op een
Cp-sil 19 capillaire kolom.



Fragmentatiepatroon Dienestrol.



Fragmentatiepatroon Hexestrol.



*Molecuulion wordt in de "Electron Impact Mode" niet waargenomen.

Bijlage 1

Fragmentatiepatroon diethylstilbestrol.

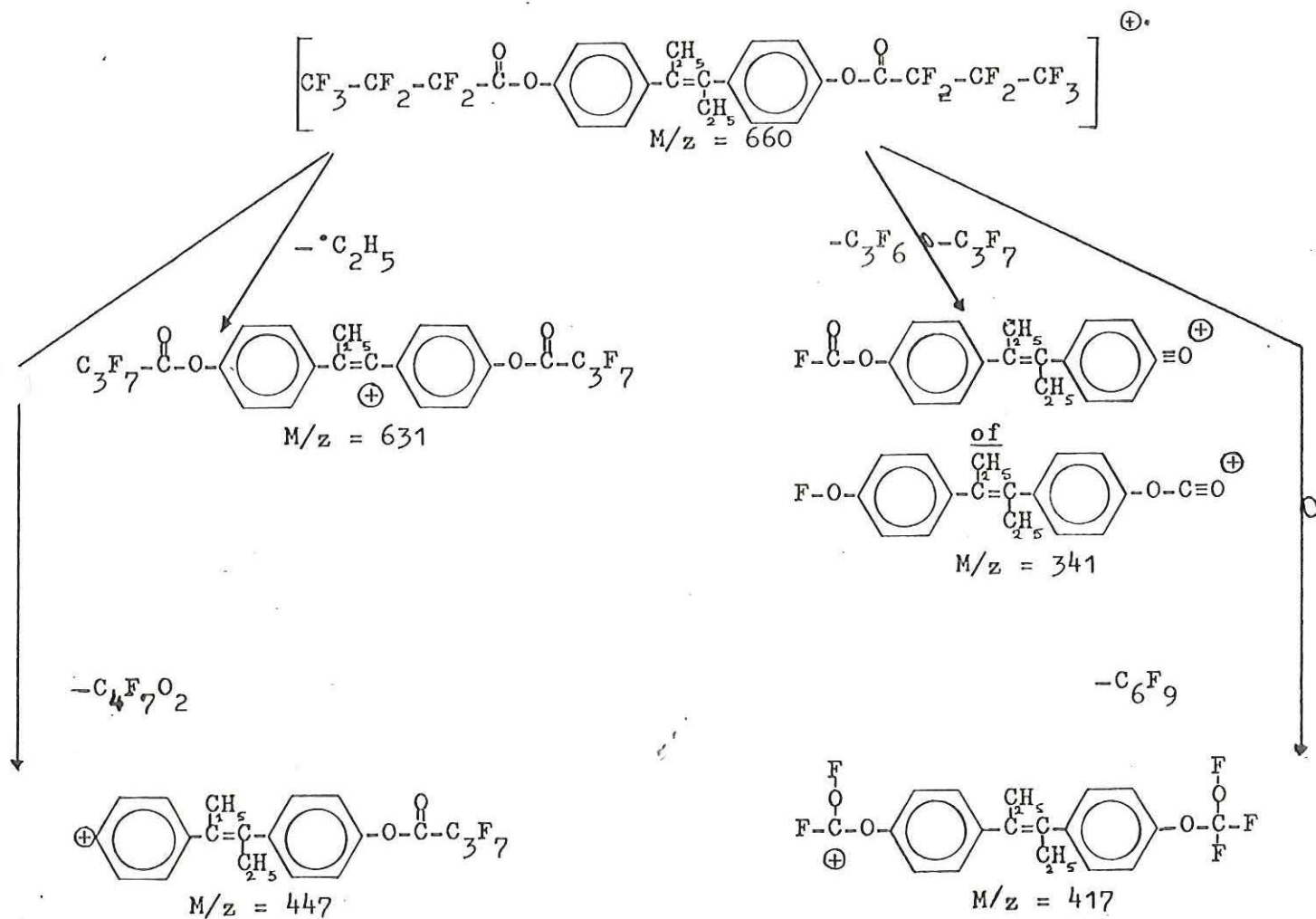


Fig. 7: Elutiepatroon van de 1e kolom bij tweedimensionale HPLC-scheiding.

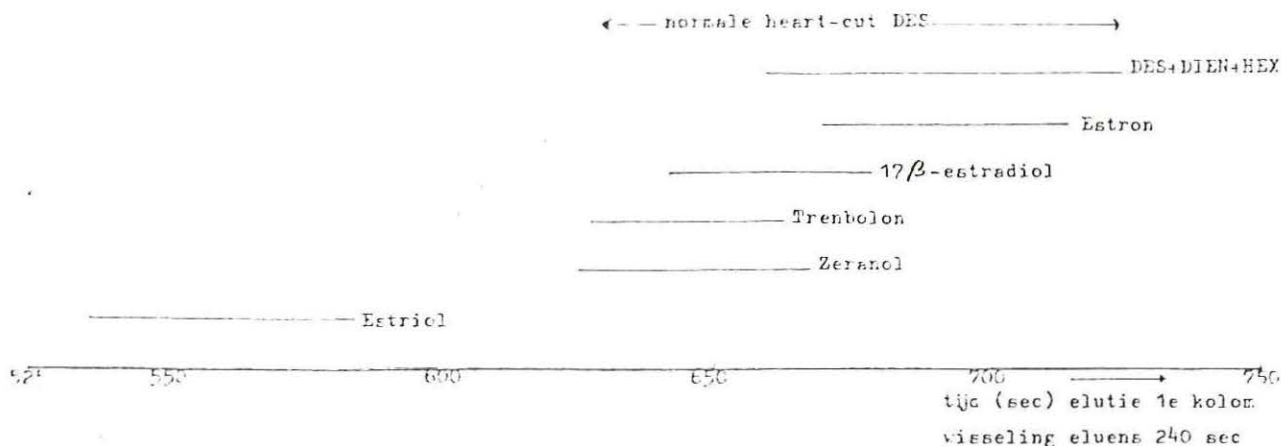


Fig. 8: Elutiepatroon van de 2e kolom bij tweedimensionale HPLC-scheiding.

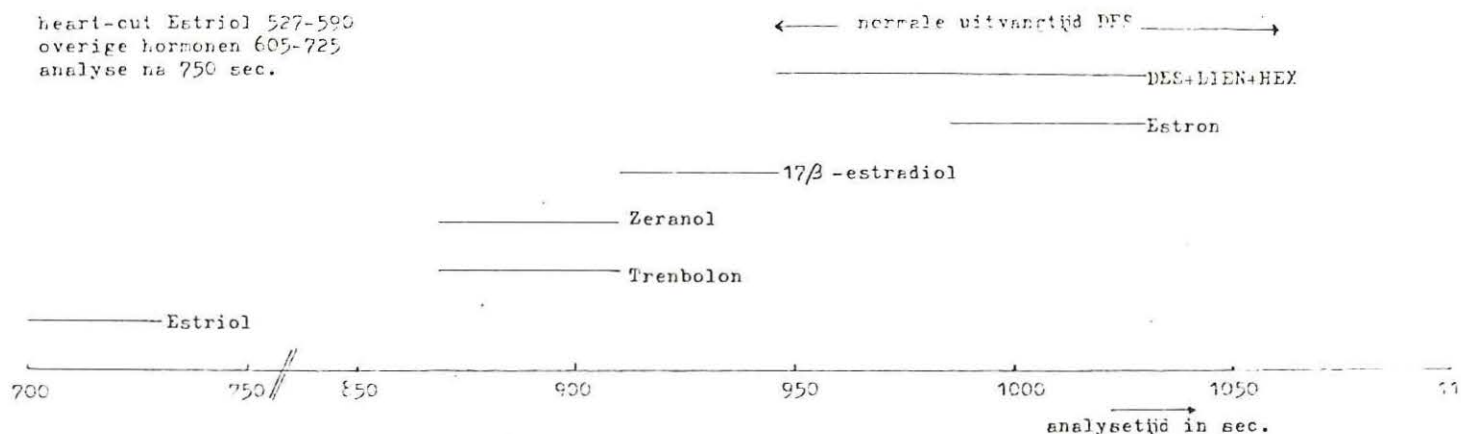


Fig. 9: Elutiepatroon bij de GPC-voorzuiivering.

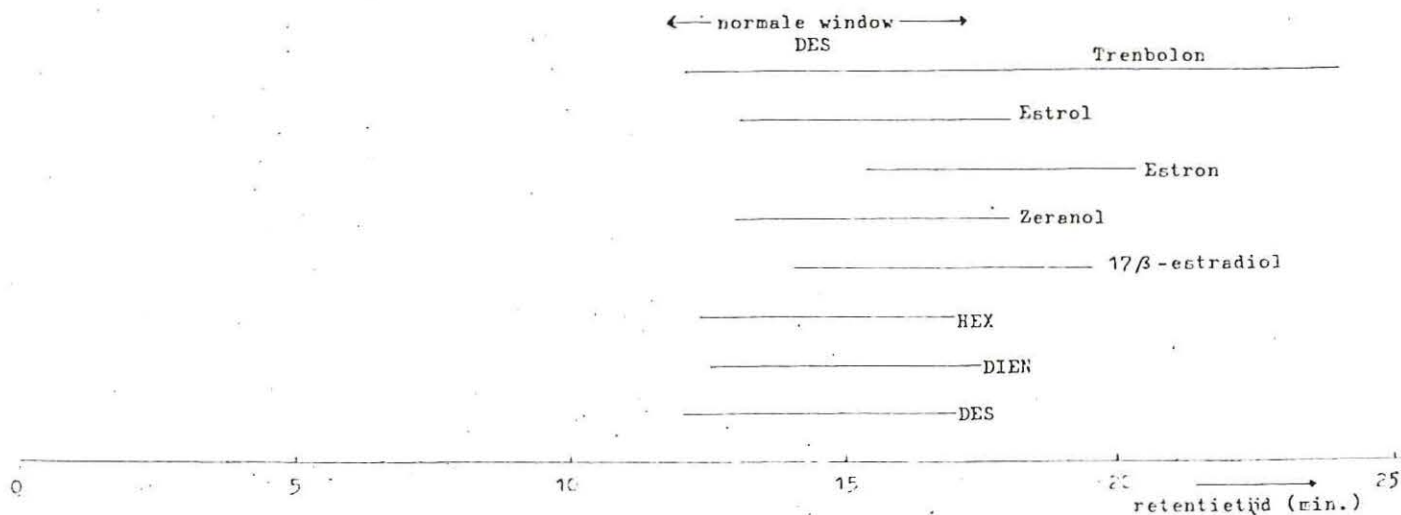


Fig. 5h: Massaspectrum Zeranol HFB derivaat.

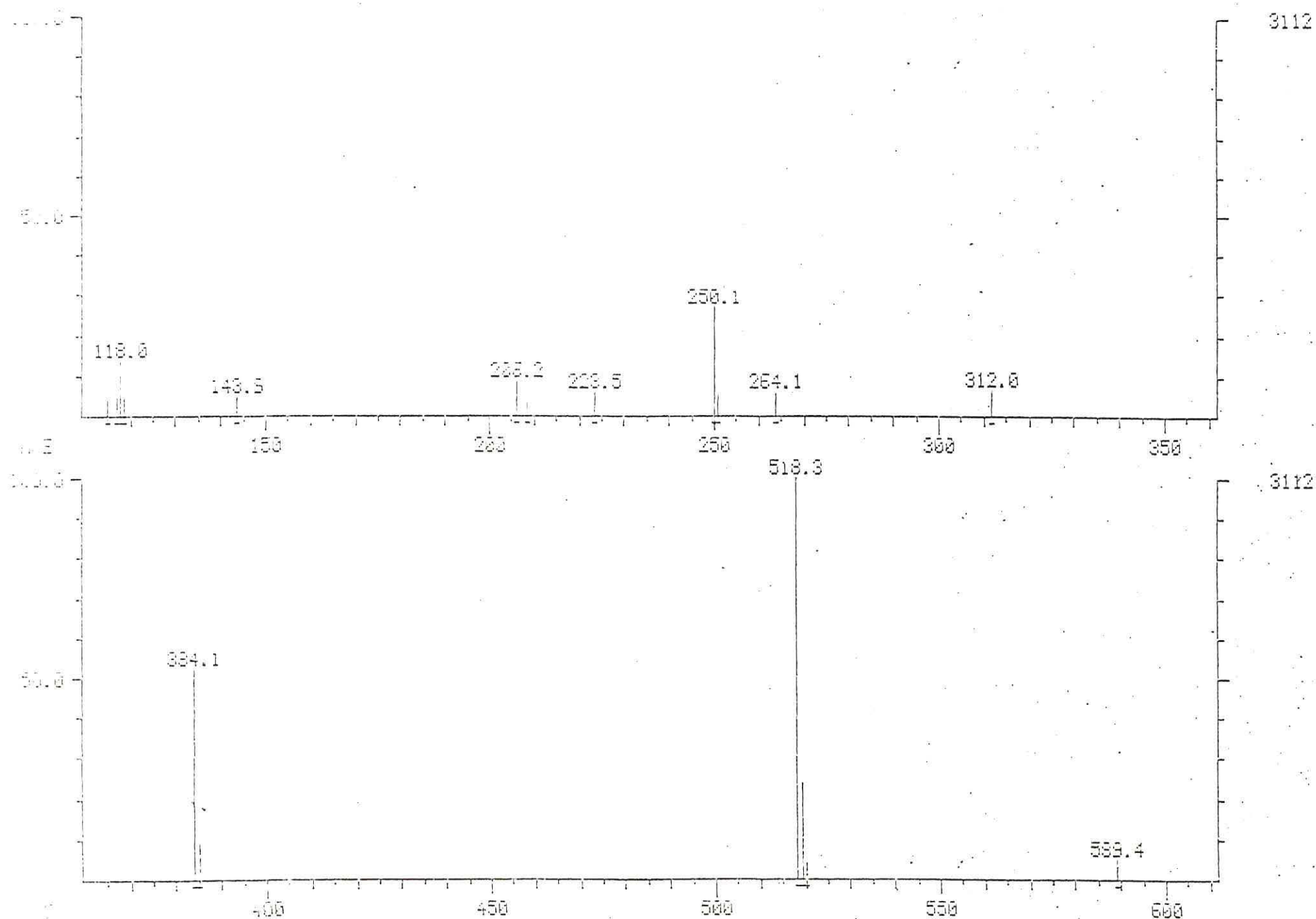


Fig. 5g: Massaspectrum Trenbolon HFB derivaat.

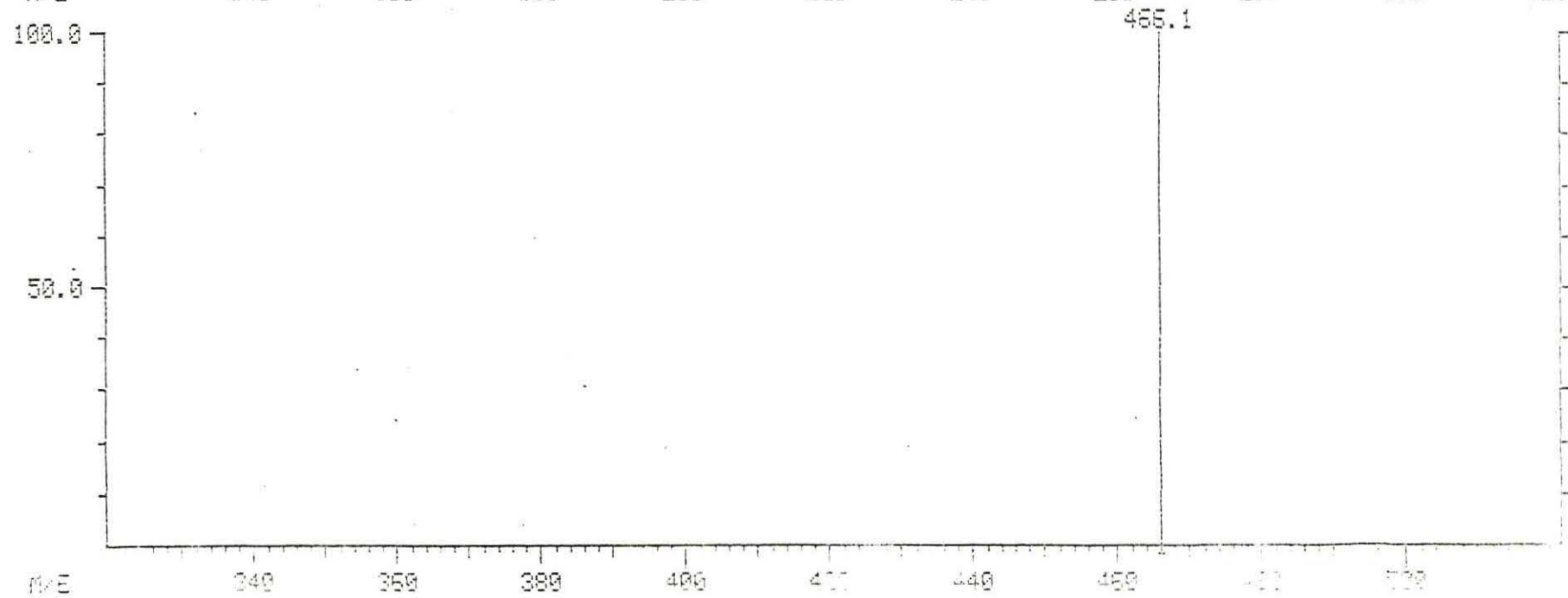
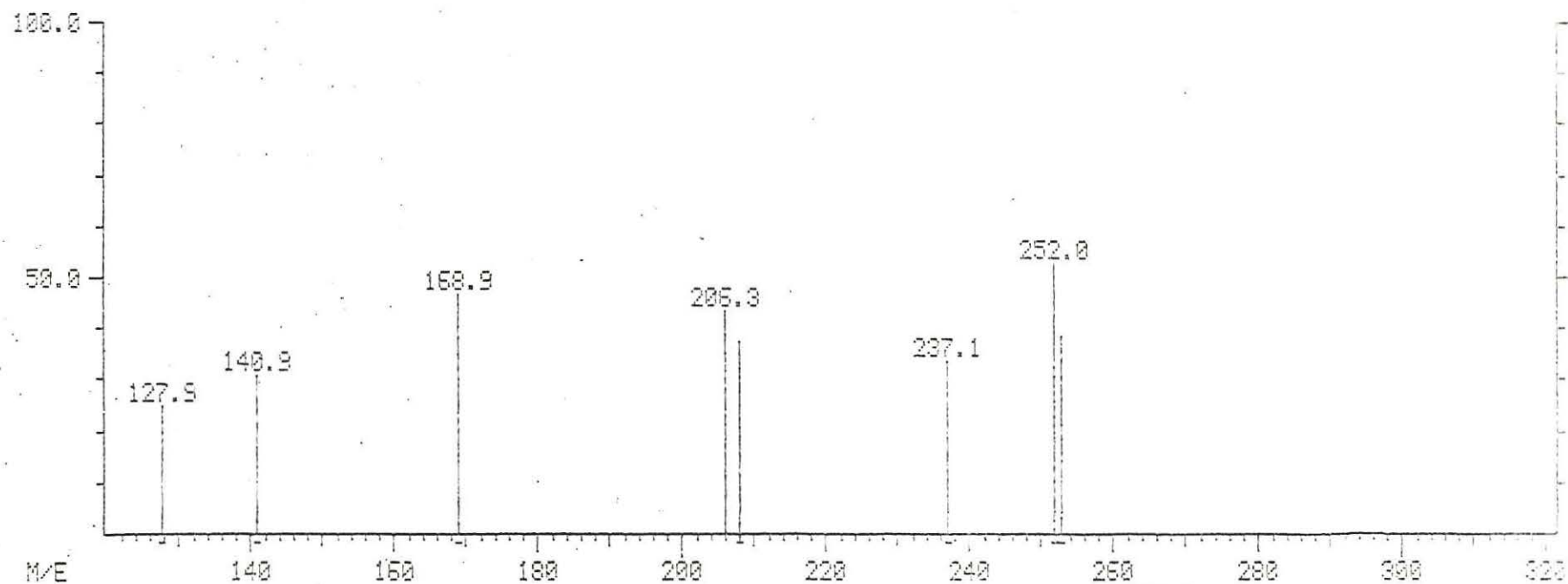


Fig. 5f: Massaspectrum Estron HFB derivaat.

